

印楝属植物表型变异分析

朱利利, 吴疆舂, 彭兴民, 郑益兴, 张燕平*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

摘要: [目的]结合分子数据确定印楝属内3个种及云南省引种栽培过程中发现的变异类型,特别是变异类型的遗传背景及它们之间的遗传关系。[方法]采用方差分析、聚类、主成分分析等方法,对云南省引种栽培的印楝、泰楝、菲楝以及引种栽培过程中发现的一个变异类型的20个表型性状进行分析。[结果]印楝属植物的形态学特征存在广泛变异,其中,小叶面积变异幅度最大,变异范围为6.09~21.50 cm²,变异系数为51.70%,其次为种子宽与小叶对数,二者变异幅度分别为0.47~0.95 cm和7.00~12.33,变异系数分别为30.34%和30.31%;主成分分析显示,印楝属植物的形态变异主要来源于小叶基部偏斜程度、小叶叶形、果实长、小叶面积、复叶长度、小叶对数。对印楝属植物和外类群近缘属植物川楝进行UPGMA聚类分析,结果表明:印楝属植物可以归为2个大类群,第一类群包括印楝、泰楝、变异类型,第二类群只包含菲楝;第一类群又可分为2个小分支,印楝和变异类型聚为1个小分支,而泰楝单独聚为1个小分支。[结论]印楝属植物叶表型性状存在广泛变异,变异类型与印楝遗传相似度最大,但是否为印楝的变种或印楝和泰楝的杂交个体有待进一步确定。

关键词: 印楝属; 形态特征; 聚类分析; 变异程度; 自然杂交

中图分类号: S792.18

文献标识码: A

Phenotypic Difference among Species and a Variation Type of *Azadirachta*

ZHU Li-li, WU Jiang-chong, PENG Xing-min, ZHENG Yi-xing, ZHANG Yan-ping

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] To reveal the morphological diversity and phenotypic traits among *Azadirachta indica* A. Juss, *Azadirachta siamensis* Val., *Azadirachta excels* (Jack) M. Jacobs and a variation type found in pure *A. indica* plantation domesticated in Yunnan, China. [Method] ANOVA, Cluster analysis and principal component analysis were used to study the 20 phenotypic traits of the three *Azadirachta* species and the variation type. [Result] There were wide variations in the morphologic features of *Azadirachta*. Among all morphologic features, the leaflet area had the maximum variation range which was 6.09~21.50 cm², with highest variance coefficient of 51.70%; followed by seed width, ranged from 0.47 cm to 0.95 cm, with the variance coefficient of 30.34%; the leaflet number ranged from 7.00 to 12.33, with variance coefficient of 30.31%. Principal component analysis showed that the main variations were resulted from leaflet deflection, leaflet shape, fruit size, leaflet area, compound leaf length and leaflet number. Clustering analysis of species and the variation type of *Azadirachta* with *Melia toosendanans* outgroup by UPGMA method showed that *Azadirachta* could be divided into two groups. One is formed by *A. indica*, *A. siamensis* and the variation type, and the other group is formed by *A. excelsa*. The former could be further divided into two subgroups, *A. indica* and the variation type could be clustered into the same subgroup, and *A. siamensis* is in the other subgroup. The variation type was most similar to *A. indica* in phenotypic traits, but with possibility of nat-

收稿日期: 2015-10-28

基金项目: 国家“十二·五”科技支撑计划项目(2012BAD21B04)

作者简介: 朱利利(1990—),女,河南驻马店人,硕士研究生,主要从事经济林栽培。E-mail: lilizhu93287@163.com

* 通讯作者。

ural variation of *A. indica* or natural hybridization between *A. indica* and *A. siamensis*, further research was required to confirm parents of the variation type.

Keywords: *Azadirachta*; morphologic features; cluster analysis; variation; natural hybridization

印楝属(*Azadirachta*)植物是楝科(Meliaceae)的热带常绿乔木,属内目前已知有3个种,分别是印楝(*Azadirachta indica* A. Juss.)、泰楝(*A. siamensis* Val.)和非楝(*A. excels* (Jack) M. Jacobs)^[1]。目前,泰楝和非楝主要分布在原产地,而印楝已被广泛引种于70多个国家和地区^[2]。本课题组自1995年开始在云南省多个地区相继引种印楝属3种植物^[3]。引种栽培过程中,在干热河谷地区种植的缅甸种源印楝林内发现一种变异类型,其个体在叶型上具有种间结合的特征。曾有调查显示,在泰国多处存在小叶形态介于印楝和泰楝的个体,推测其可能为当地的自然杂交个体(未见育性报道)^[4]。对于云南干热河谷地区的这一变异类型的遗传背景尚不清楚,目前无法确定其是否也由印楝属植物自然杂交形成。此外,一些学者对印楝属内植物的区别和划分存在一些分歧,主要是泰楝独立成种或是作为印楝的变种。国内外对印楝的活性物质及其特性研究较多^[5-9],而对于印楝属植物的遗传分类研究较少;特别是国内对这方面的研究几乎没有,仅见彭兴民等^[10]对印楝属植物分类的描述以及印楝种群表型研究^[11-12],缺乏对泰楝、非楝以及印楝属内变异或杂交遗传背景的探索。

本研究在项目组引种栽培印楝属植物的基础上,以印楝、泰楝、非楝以及引种发现的变异类型的叶片、花和种子为材料,对其表型性状进行观测和统计分析,以检测印楝属不同物种的形态变异程度,揭示各个种和变异类型间的基础遗传背景以及它们之间的遗传关系,为印楝属植物种质资源保护、开发利用、良种的选育提供理论参考。

1 引种地概况

印楝属植物引种栽培于云南省元阳县的中国林科院资源昆虫所的药用试验示范林和种质圃,属于红河流域干热河谷地区,年平均气温24.4℃,最高气温44.1℃,最低气温3.7℃;年平均降水量899.5 mm,最高1 189.1 mm,最低665.7 mm。

2 材料与方

2.1 试验材料

试验材料为分批次引进的印楝、泰楝和非楝种

子所培育的3年生实生苗以及印楝纯林内发现的变异类型。2015年4月至7月,随机选取印楝、泰楝和非楝6株健康植株,变异类型数量少,仅有2株,采集无病害完整的叶、花和种子进行形态学测量。种源来源、采集地点以及生境状况见表1。

表1 印楝属植物种源及引种概况

植物	种源地	采集地点	生境
印楝	缅甸	元阳县水塘村	平地
泰楝	缅甸	元阳县水塘村和那里村	平地与台地
非楝	泰国	元阳县那里村	平地
变异类型	缅甸	元阳县水塘村和那里村	平地

2.2 试验方法

选择印楝属植物遗传稳定的表型性状进行测量,选取复叶长度、小叶对数、小叶长、小叶宽、小叶长宽比、小叶面积、侧脉数目、果实长、种子长、种子宽、种子长宽比、萼片数、花瓣数、可育花药数量共14个表型数量性状作为连续的形态指标进行测定,叶指标取样数为50,花和种子指标取样数目为30;选取羽状复叶类型(奇数或偶数)、小叶叶型(椭圆或披针)、小叶叶缘情况、小叶基部偏斜程度,花瓣颜色、花丝是否连合共6个质量性状作为离散的形态指标进行观察与记录。

2.3 数据分析

计算印楝属植物表型数量性状的均值、标准差和变异系数,了解性状间的变异和离散程度,并利用单因素方差分析和主成分分析研究表型性状差异是否显著和造成差异的主要指标。采用与印楝属亲缘关系相近的楝属(*Melia*)植物川楝(*Melia toosendan* Sieb. et Zucc.)作为外类群进行UPGMA聚类分析,了解种间亲缘关系。

以上数据处理利用Excel2007、Spss18.0和NT-SYS PC 2.1e^[13]软件完成。

3 结果与分析

3.1 印楝属植物各性状方差及变异分析

印楝属植物的20个表型性状的统计分析表明(表2~4):印楝属植物的11个数量性状在种间存在较为广泛的变异;小叶面积变异幅度最大,变异范围为6.09~21.50 cm²,变异系数为51.70%;其次为种子宽与小叶对数,二者变异幅度分别为0.47~0.95

cm 和 7.00 ~ 12.33, 变异系数分别为 30.34% 和 30.31%; 而复叶长、小叶宽、侧脉数目、果实长、种子长的变异系数分布在 20.78% ~ 24.54%, 小叶长、小叶长宽比以及种子长宽比的变异系数分布在 11.02% ~ 16.03%; 而萼片数、花瓣数以及可育花药数量在物种间没有差异(表 2), 11 个表型数量性状在印楝属各物种及变异类型间的差异均极显著($P < 0.01$), 其中, 小叶面积的 F 值最大为 270.22, 种子长宽比 F 值最小

为 13.56(表 2); 在各物种及变异类型内数量性状的变异中, 变异系数分布在 5.43% ~ 28.97%, 小叶面积的变异幅度最大, 果实长的变异幅度最小(表 2 ~ 3)。在质量性状方面, 羽状复叶类型、花瓣颜色以及花丝是否连合性状在印楝属植物间没有差异, 小叶叶形和小叶基部偏斜程度性状在印楝、泰楝变异类型之间没有区别但与菲楝存在差异, 小叶叶缘性状在印楝属植物间也存在变异(表 4)。

表 2 印楝属植物间表型数量性状方差分析

项 目	复叶长 /cm	小叶 对数/对	小叶长 /cm	小叶宽 /cm	小叶长 宽比	小叶面 积/cm ²	侧脉 数目/对	果实长 /cm	种子长 /cm	种子宽 /cm	种子长 宽比	萼片 数/片	花瓣 数/片	可育花药 数量/个
印楝	27.43d	7.12b	6.69d	1.91c	3.59a	6.09d	13.76a	2.05b	1.54b	0.58c	2.64a	5	5	10
泰楝	30.12c	7.00b	8.37b	3.10a	2.77c	18.96b	10.16b	2.07b	1.56b	0.76b	2.14b	5	5	10
菲楝	44.96a	12.33a	9.62a	3.17a	3.01b	21.50a	7.86d	2.85a	2.03a	0.95a	2.23b	5	5	10
变异类型	32.95b	7.50b	7.32c	2.40b	3.09b	9.93c	9.26c	1.63c	1.23c	0.47d	2.65a	5	5	10
平均值	33.87	8.49	8.00	2.64	3.11	14.12	10.26	2.15	1.59	0.69	2.42	5	5	10
标准差	7.73	2.57	1.28	0.60	0.34	7.30	2.52	0.51	0.33	0.21	0.27	0.00	0.00	0.00
变异系数/%	22.83	30.31	16.03	22.76	11.07	51.70	24.54	23.59	20.78	30.34	11.02	0.00	0.00	0.00
F 值	66.03	83.78	69.95	60.95	24.66	270.22	145.74	65.27	67.64	43.75	13.56	-	-	-
P 值	0.00**	0.00**	0.00**	0.00**	0.00**	0.00**	0.00**	0.00**	0.00**	0.00**	0.00**	-	-	-

注: a、b、c、d 为 Duncan grouping 表示值, 字母相同者为差异不显著。* *: 差异极显著 ($P \leq 0.01$), -: 该值不存在。

表 3 印楝属植物内表型数量性状的变异系数

植 物	性状变异系数/%								
	复叶长	小叶对数	小叶长	小叶宽	小叶面积	侧脉数目	果实长	种子长	种子宽
印楝	21.26	13.95	13.12	14.18	25.62	13.34	5.43	10.37	11.07
泰楝	18.80	16.85	10.87	27.01	18.07	12.63	8.81	10.96	26.22
菲楝	21.57	16.26	15.29	13.90	17.74	12.85	10.13	16.11	28.97
变异类型	15.35	6.92	12.28	17.48	27.42	12.87	13.65	19.92	12.23

表 4 印楝属植物间表型质量性状特征

植 物	性状特征值					
	羽状复 叶类型	小叶 叶形	小叶 叶缘	小叶基部 偏斜程度	花瓣 颜色	花丝是 否连合
印楝	1	1	0	0	1	1
泰楝	1	1	1	0	1	1
菲楝	1	0	2	1	1	1
变异类型	1	1	1	0	1	1

注: 羽状复叶类型奇数和偶数分别标为 1 和 0; 小叶叶形披针形和椭圆形分别标注 1 和 0; 小叶叶缘锯齿、浅波兼锯齿、全缘分别标注为 0、1 和 2; 小叶基部偏斜程度轻度偏斜和重度偏斜分别标注 1 和 0, 花瓣颜色白色和淡紫色(外类群川楝的花瓣为淡紫色)分别标注为 1 和 0, 花丝连合和不连合分别标注 1 和 0。

3.2 表型性状的主成分分析

对印楝属 4 种植物类型的 14 个存在变异的表型性状进行主成分分析。由表 5 可知: 4 个特征根大于 1 的主成分累计贡献率为 82.107%, 已经代表了 14 个性状所提供的大部分信息, 可用于对表型变异进行综合评价(一般要求累计贡献率达 70% ~ 85%)^[14]。分析结果表明: 第 1 主成分的累计贡献

表 5 前 4 个主成分的负荷量、特征值、贡献率和累计贡献率

形态指标	主成分			
	1	2	3	4
复叶长度	0.643	0.277	-0.206	-0.279
小叶对数	0.655	0.456	-0.035	0.065
小叶长	0.185	-0.741	-0.098	0.050
小叶宽	0.528	-0.664	-0.296	0.374
小叶长宽比	-0.547	0.234	0.351	-0.503
小叶面积	0.756	-0.471	0.163	0.111
侧脉数目	-0.664	0.167	0.569	0.119
果实长	0.777	0.110	0.477	0.035
种子长	0.548	0.075	0.654	0.359
种子宽	0.542	-0.557	0.378	-0.381
种子长宽比	-0.330	0.740	-0.016	0.480
小叶叶形	-0.889	-0.338	-0.070	0.064
小叶叶缘	0.670	0.520	-0.428	-0.141
小叶基部偏斜程度	0.889	0.338	0.070	-0.064
特征值	5.803	3.048	1.605	1.038
贡献率/%	41.453	21.771	11.467	7.416
累计贡献率/%	41.453	63.224	74.691	82.107

率为41.453%,主要由小叶基部偏斜程度、果实长、小叶面积、复叶长度、小叶对数和小叶宽决定,其中,小叶基部偏斜程度系数最大,且小叶基部偏斜程度和小叶叶形有反向趋势;第2主成分的贡献率为21.771%,主要由种子长宽比和小叶叶缘决定;第3主成分的贡献率为11.467%,主要由种子长和侧脉数决定;第4主成分的贡献率为7.416%,各个性状的系数较低。

3.3 表型性状的聚类分析

计算印楝、泰楝、菲楝、变异类型以及外类群川楝间的欧式距离后以非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析。印楝属植物和外类群川楝的遗传距离系数(表6)显示:物种和类型两两之间的遗传距离系数分布在2.827~7.555间,其中,川楝和印楝的遗传距离系数最大为7.555,表明二者之间的遗传相似度最小;印楝和变异类型之间的遗传距离系数最小为2.827,表明印楝和变异类型的遗传相似度最大。聚类结果(图1)表明:5种植物类型总体上归为两大类群,其中,印楝属植物归为第1类群;川楝单独归为第2类群。印楝属内又可分为2个类群,印楝、变异类型、泰楝在形态特征上比较相似,聚为第1个分支;菲楝单独归为第2个分支;其中,第1个分支又可分为2类,印楝和变异类型聚为1类,泰楝单独聚为1类。

表6 印楝属植物与川楝的欧式距离系数矩阵

植物	印楝	变异类型	泰楝	菲楝	川楝
印楝	-				
变异类型	2.827	-			
泰楝	4.160	2.922	-		
菲楝	6.897	5.777	4.568	-	
川楝	7.555	7.240	5.849	6.376	-

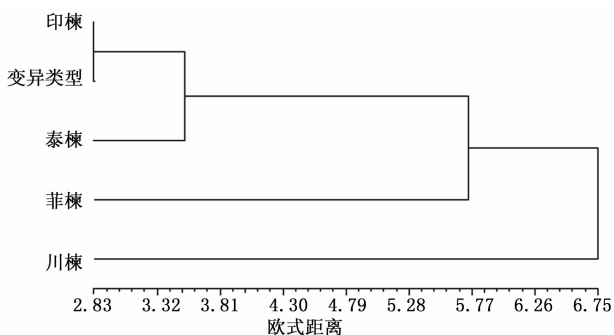


图1 印楝属植物与川楝的形态聚类图(UPGMA法)

4 讨论与结论

4.1 印楝属植物叶表型性状存在广泛变异

形态性状包含数量性状和质量性状,二者受自

身遗传特性和环境因素的影响,数量性状较易受环境因素的影响,而质量性状遗传效应稳定,受环境影响较小。前期研究显示,印楝的树高、冠幅和株产果实数等一些营养性状与地理环境因子密切相关^[12]。本研究材料栽培和管理条件一致,但印楝属植物的一些表型性状在各个种和变异类型之间仍存在较大的差异,表明印楝属植物间的表型性状差异主要源于自身遗传组成,差异主要表现在叶和种子的形态变化。主成分分析表明,不同印楝属植物的小叶基部偏斜程度、小叶叶形、小叶面积、复叶长度、小叶对数、种子长和宽,小叶叶缘是表型差异和聚类的主要依据。印楝、变异类型和泰楝三者之间遗传关系较近,聚为一个类群,而非楝与三者遗传关系较远,单独聚为一类,这主要与小叶叶形有关,前三者的小叶表型性状比较相近,特别是小叶的质量性状几乎一致,而非楝的叶表型性状与另外三种差异较大。

4.2 印楝属植物的遗传关系分析

对于印楝和泰楝的分类学地位,一直都存在着争议。有印度学者认为,泰楝和印楝在野外存在自然杂交种,认为泰楝是印楝的一个变种^[15-16];而另外一些学者如 Schmutterer^[17]支持泰楝独立成种,理由是泰楝与印楝在生理生态特性、表型特征、木材解剖特征、次生代谢化合物特征等方面存在显著不同,这一观点正逐渐被学术界接受^[18]。本课题组的研究表明,印楝种内异株传粉的异交率高达96.27%^[19],而在掌握花粉活力与柱头可授性规律基础上进行的印楝与泰楝间的人工正反交授粉却未见结实(未发表数据),不能自由杂交,存在明显生殖隔离,因而不支持泰楝作为印楝生态变型或变种的观点;但这种种间生殖隔离不是绝对的。通常,种间杂交不亲和障碍有7类,表现为^[20]:花粉萌发失败、花粉管在柱头表面发生异常、花粉管在花柱引导组织内发生异常、花粉管无法达到子房、花粉管无法进入珠孔、花粉管无法进入胚囊及花粉管无法释放精细胞至胚囊。这些种间杂交不亲和障碍同时也是自交不亲和障碍。根据本课题组之前对印楝繁育系统进行的研究^[21],印楝花药和柱头的成熟期并没有在时间上完全分离,花粉活性与柱头可授期之间存在重叠,且形态上柱头与花药相距很近,花药开裂时柱头很容易沾上自花花粉;而印楝又具有超过90%的高异交率,说明印楝还通过这些传粉后障碍机制以尽量避免自交的发生;然而,不同种类花粉间的相互影响可能改变柱头的生理环境,干扰花粉外壁和母本

柱头糖蛋白的识别作用,促使花粉与柱头水合并萌发,模拟此机理衍生的混合花粉授粉经常为早期育种家使用^[22]。据此,当少量泰楝花粉混合印楝花粉落至印楝柱头上后,也有可能使种间亲和障碍受到干扰解除,并且,这种结实情况由于发生几率有限,也符合在原产地仅发现一些中间叶型的个体,而非自由杂交状态下出现规模化生态过渡型或渐变型的实际情况。

本课题组在元阳发现的变异类型可能是因为当年引种的种子在原产地是种间杂交所产种子或植株由于生境的改变而发生变异。目前正通过多个母系遗传的叶绿体基因片段和双亲遗传的核基因片段对变异类型种质来源作仔细的区分和鉴别。对已有的变异类型包括自然杂交类型进行筛选和鉴定,是充分利用种质资源,拓展良种选育的途径。

参考文献:

- [1] M. M. P. N. D. , Multilingual Multiscript Plant Name Database, <http://www.plantnames.unimelb.edu.au/>.
- [2] Schmutterer H. The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other meliaceous plants: sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes[M]. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995: 1-34.
- [3] 张燕平, 赖永祺, 彭兴民, 等. 印楝的世界地理分布与引种栽培概况[J]. 林业调查规划, 2002, 27(3): 98-101.
- [4] Sombatsiri K, Ermel K, Schmutterer H. Other meliaceous plants containing ingredients for integrated pest management and further purpose. The Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss and other meliaceous plants[M]. Germany: VCH, 1995: 585-597.
- [5] Hashmat I, Azad H, Ahmed A. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)-A nature's drugstore: an overview[J]. International Research Journal of Biological Sciences, 2012, 1(6): 76-79.
- [6] Liu N, Sun B, Wu P, et al. Chemopreventive Effects of *Azadirachta indica* on Cancer Marker Indices and Ultrastructural Changes During 1, 2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinogenesis in Rats[J]. Cell biochemistry and biophysics, 2015, 1(73): 101-106.
- [7] Thanigaivel S, Vijayakumar S, Gopinath S, et al. In vivo and in vitro antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected *Tilapia (Oreochromis mossambicus)* [J]. Aquaculture, 2015, 1(437): 252

- 255.
- [8] 王有琼, 马李一, 张重权, 等. 印楝叶多酚提取及体外抗氧化活性[J]. 精细化工, 2015, 1(32): 64-68.
- [9] 彭兴民, 吴疆翀, 王有琼, 等. 药用印楝表型选择的因子分析及综合评价[J]. 林业科学研究, 2015, 28(4): 464-472.
- [10] 彭兴民, 吴疆翀, 张燕平, 等. 印楝属(*Azadirachta* A. Juss.) 植物分类及分布的研究现状[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 583-588.
- [11] 彭兴民, 吴疆翀, 郑益兴, 等. 云南引种印楝实生种群的表型变异[J]. 植物生态学报, 2012, 36(6): 560-571.
- [12] 彭兴民, 吴疆翀, 郑益兴, 等. 云南引种印楝实生栽培种群表型的地理变异[J]. 林业科学研究, 2013, 26(4): 399-405.
- [13] Rohlf F J. NTSYSPC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. New York: Exter Publishers, 1994.
- [14] 刘仁权, 史周华, 李国春, 等. SPSS 统计软件[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 161.
- [15] Dhilon R S, Ahlawat K, Pundir J S. Botany of Neem[C] // Singh K K, Phogat S, Tomar A, et al. Neem: A Treatise. New Delhi, India: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2008: 30-43.
- [16] Tomar A, Singh K K. Neem: An Introduction[C] // Singh K K, Phogat S, Tomar A, et al. Neem: A Treatise. New Delhi, India: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2008: 3-15.
- [17] Schmutterer H. The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss. And other meliaceous plants: sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes [M]. Weinheim: VCH, Verlagsgesellschaft mbH, 1995: 585-597.
- [18] Chowdhary A, Singh V. Geographical distribution, Ethnobotany and Indigenous Uses of Neem[C] // Singh K K, Phogat S, Tomar A, et al. Neem: A Treatise. New Delhi, India: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2008: 16-29.
- [19] 吴疆翀, 彭兴民, 郑益兴, 等. 印楝异交率和基因流的分析[J]. 林业科学研究, 2008, 21(5): 593-598.
- [20] 解玮佳, 李世峰, 李树发, 等. 高山杜鹃与大喇叭杜鹃种间杂交过程的观察研究[J]. 西北植物学报, 2012, 32(12): 2432-2437.
- [21] 吴疆翀. 印楝繁育系统的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007: 42-43.
- [22] 徐义流, 张绍铃. 花粉-雌蕊相互作用的分子基础[J]. 西北植物学报, 2004, 23(10): 1800-1809.

(责任编辑: 张 玲)